ÜBER DAS FREIE UND GEBUNDENE ÖSTRADIOL IM PLASMA VON MÄDCHEN MIT PUBERTAS PRAECOX UND VON JUNGEN MIT GYNÄKOMASTIE

Robert Maier

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547005_0029

Aus der Kinderklinik der Universität München
Direktor: Prof.Dr.K.Betke

ÜBER DAS FREIE UND GEBUNDENE ÖSTRADIOL IM PLASMA VON MÄDCHEN MIT PUBERTAS PRAECOX UND VON JUNGEN MIT GYNÄKOMASTIE

Inaugural-Disseration
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Robert Maier
aus Freising

1979

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz.Dr.med.Dipl.Biochem. Frank Bidlingmaier
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.K.Betke
Dekan:	Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

B. I. Methode der Gleichgewichtsdialyse

B. I. a. Prinzip der Gleichgewichtsdialyse

B. I. b. Die Gleichgewichtsdialyse-Apparatur

B. I. c. Die Dialyse-Membran

B. I. d. Einlegen der Membranen in die Kammern
Aufbau der Zellenblöcke

B. I. e. Das Füllen und Leeren der Dialysezellen

B. II. Reagenzien und Lösungen

B. II. a. Die verwendeten Reagenzien

B. II. b. Der verwendete Puffer

B. II. c. Herstellung der radioaktiven Steroidlösung

B. III. Die Aufbereitung der Proben

B. III. a. Bestimmung der Radioaktivität der Proben

B. III. b. Berechnung des freien und gebundenen Anteils
des Plasmasteroids.

B. III. c. Schema des Arbeitsablaufs.

B. IV. Vorversuche zur Optimierung der Methode

B. IV. a. Abhängigkeit der Dialyse vom Grad der Plasma-
verdünnung

B. IV. b. Zeitabhängigkeit der Gleichgewichtsdialyse

B. IV. c. Abhängigkeit der Dialyse von der Konzentration
des radioaktiven Steroids.

B. IV. d.Abhängigkeit der Dialyse vom pH der Pufferlösung und der Temperatur der Badflüssigkeit

B. V. Qualitätskontrolle, Praktikabilität und Diskussion der Methode

B. V. a. Reproduzierbarkeit innerhalb der Serie und Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag

B. V. b. Praktikabilität der Methode

B. V. c. Diskussion der Methode

C. Normalwerte

C. I. Patientenkollektiv

C. II. Mädchen

Zahl, Alter, Einteilung

Graphische Darstellung der Meßwerte

Statistische Auswertung

C. III. Jungen

Zahl, Alter, Einteilung

Darstellung der Meßwerte

Statistische Auswertung

C. IV. Vergleich Jungen mit Mädchen

Graphische Darstellung der Meßwerte

Statistische Auswertung

D. Prozentuale Bindung von Plasmaöstradiol bei Mädchen mit Pubertas praecox im Vergleich mit gesunden Mädchen

Patientenkollektiv

Vergleich graphisch dargestellt

Statistische Auswertung

E. Prozentuale Bindung von Plasmaöstradiol bei Jungen mit Pubertätsgynäkomastie im Vergleich mit gesunden Jungen

Patientenkollektiv

Graphische Auswertung

Statistische Auswertung

F. Besprechung der Ergebnisse

G. Zusammenfassung

H. Literaturverzeichnis

A. Die idiopathische Pubertas praecox bei Mädchen und die Pubertätsgynäkomastie bei Jungen gelten als Störung der Entwicklung des Endokriniums (19). Früher nahm man als sicher an, daß eine erhöhte Produktion von Geschlechtshormonen die Ursache für die Symptome sind. Bei Mädchen mit Pubertas praecox wurden tatsächlich erhöhte Gonadotropin- und Östrogenspiegel im Urin gefunden, doch bei der genauen Untersuchung der Östrogene und Gonadotropine im Plasma stellte sich heraus, daß die Hormonspiegel bei Mädchen mit idiopathischer Pubertas praecox weniger stark erhöht waren, als man nach den Symptomen (Brustentwicklung, vaginale Blutung, Knochenreifung) erwarten konnte. Die Hormonkonzentrationen bei Mädchen mit Pubertas praecox liegen deutlich niedriger als die Werte bei normalreifen Mädchen gleicher Entwicklungsstufe (5).

Im Plasma von Patienten mit Pubertätsgynäkomastie wurden von verschiedenen Gruppen (2,3,20) weder erhöhte Östrogenspiegel, noch eine Verschiebung des Östrogen-Androgen-Quotienten gefunden. Bisher ist noch unklar, wie die relativ niedrigen Hormonspiegel die deutliche Feminisierung bewirkten. Eine Möglichkeit ist, daß der biologisch aktive Anteil der Östrogene dieser Patienten erhöht ist (5).

SLAUNWHITE et al. (29) und VERMEULEN et al. (34) haben gezeigt, daß nur der freie, nicht proteingebundene Anteil der einzelnen Hormone biologisch wirksam ist. In der Folgezeit wurden Methoden zur Bestimmung dieses freien Hormonanteils wie Gleichgewichtsdialyse, Ultrafiltration durch

Zentrifugieren sowie Ultrafiltration im Vakuum entwickelt (11, 24). Von diesen Methoden hat sich die Gleichgewichtsdialyse durchgesetzt, da sie einerseits gut reproduzierbare Ergebnisse liefert, andererseits sicher und relativ einfach zu handhaben ist.

In der Kinderheilkunde fand diese Methode nur vereinzelt Anwendung (12).

Beim Kind erfordert sie wegen der niedrigen endogenen Hormonspiegel relativ große Plasmamengen, die schwer zu gewinnen sind. Seit kurzer Zeit jedoch steht ein Gerät zur Verfügung, das eine Gleichgewichtsdialyse für Sexualhormone mit Plasmamengen im ul-Bereich ermöglicht (9). Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Bestimmung des freien und proteingebundenen Anteils von Östradiol bei gesunden Jungen und Mädchen sowie bei Mädchen mit idiopathischer Pubertas praecox und bei Jungen mit Pubertätsgynäkomastie.

B. I. Methode der Gleichgewichtsdialyse

B. I. a. Das Prinzip der Gleichgewichtsdialyse

Das Prinzip der Gleichgewichtsdialyse (1o, 29) besteht darin, daß gelöste niedermolekulare Substanzen in freier Form durch eine semipermeable Membran diffundieren können, während sie an höhermolekulare Substanzen gebunden durch diese Membran zurückgehalten werden. Die niedermolekularen Substanzen können sowohl anorganische Stoffe wie Eisen und Kupfer, als auch organische Verbindungen wie die Sexualhormone, das Cortisol und die Schilddrüsenhormone sein. Bei den höhermolekularen Verbindungen handelt es sich um Plasma-Albumin und um ß-Globulinfraktionen wie Transferrin, Coeruloplasmin, Sexualhormon bindendes Globulin, Transcortin und Thyreoglobulin. Die Diffusion der freien niedermolekularen Substanzen durch die Membran erfolgt so lange, bis ein Gleichgewichtszustand zwischen den freien Molekülen auf beiden Seiten der Membran erreicht ist. Der Gleichgewichtszustand ist abhängig von den Affinitäten, die der niedermolekulare Stoff zu der höhermolekularen Verbindung besitzt. Beschrieben wird diese Diffusion durch das 1. Fick`sche Gesetz: Die Einstellung des Diffusionsgleichgewichts ist von der Membranfläche, dem Konzentrationsgradienten und dem Diffusionskoeffizienten abhängig, wobei dieser eine Funktion der Temperatur und der Art der niedermolekularen Substanz ist. Bei der Bestimmung des gebundenen Anteils des Plasma-Östradiols befindet sich auf der einen Membranseite radioaktives Östradiol

in Pufferlösung und auf der anderen Seite endogenes Östradiol in der Plasmaprobe.

Im Plasma liegt das Sexualhormon bindende Globulin (SHBG) vor, das mit unterschiedlicher Affinität Sexualhormone bindet. Mercier-Bodard (21) fand Assoziationskonstanten von von $K = 1{,}2 \cdot 10^{-9}$ bzw. $0{,}5 \cdot 10^{-9}$ M^{-1} für Testosteron und und Östradiol. Östradiol wird also nur rund halb so stark wie Testosteron an das Globulin gebunden. Zum Austausch durch die Membran stehen auf der einen Seite das freie Östradiol der Plasmaprobe, auf der anderen Seite zugefügtes radioaktiv markiertes Östradiol in Puffer zur Verfügung. Der Austausch erfolgt so lange, bis sich ein Gleichgewicht zwischen den freien Östradiolanteilen in den beiden durch die Membran getrennten Kammern eingestellt hat.

B.I. b. Die Gleichgewichtsdialyse-Apparatur

Für die Plasmadialyse zur Bestimmung des freien Hormonanteils standen nur relativ geringe Mengen an Plasma zur Verfügung, da Kleinkindern die Abnahme größerer Blutmengen nicht zumutbar ist und andere Untersuchungen mit höherem Plasmabedarf, so zum Beispiel die Messung der absoluten Hormonkonzentration, der Dialyse vorausgegangen sind.
Die Dianorm Apparatur wurde für die folgenden Untersuchungen gewählt, da mit ihr eine Dialyse mit geringen Plasmamengen möglich ist.

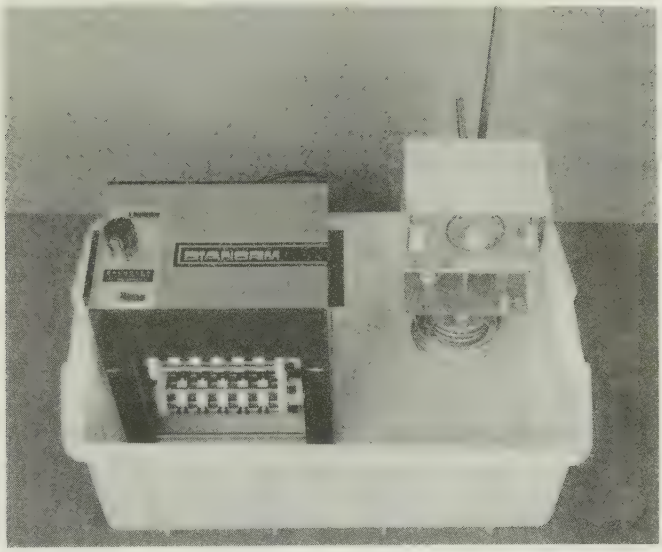

Abb. 1 Das Dianorm- Gerät der Fa. Bachofer, Reutlingen

Bei dem System trennt die semipermeable Membran eine Dialyse-Zelle aus Teflon in zwei Zellenhälften. Bei den für die Östradioluntersuchungen gewählten Zellen beträgt das Dialysevolumen je Zellenhälfte 1ooo µl.
Fünf Dialyse-Zellen bilden zusammen einen Zellenblock. Vier derartige Zellenblöcke können gleichzeitig in eine Apparatur eingesetzt werden, die durch einen Elektromotor angetrieben, die Zellenblöcke alle mit gleicher Geschwindigkeit rotieren läßt. Es können also mit dem Gerät 2o Bestimmungen nebeneinander durchgeführt werden.

Um die Dialyse bei konstanter Temperatur von 37°C ausführen zu können, wird das Dianorm-Gerät in ein thermostatisiertes Wasserbad gestellt. Durch schonende Rotation von 6 bis 10 Umdrehungen pro Minute um eine Achse senkrecht zur Membran werden die Lösungen durchmischt, so daß sich das Diffusionsgleichgewicht rasch einstellen kann. Bereits nach 10 Minuten ist bei dem Gerät ein nahezu vollständiger Wärmeaustausch zwischen Wasserbad und Kammerinhalt ein

B. I. c. Die Dialyse-Membran

Als Dialyse-Membran eignet sich der Spectrapor-Cellulose Membranschlauch der Firma Spectrum, Medical industries, INC, Los Angeles 90054. Die Porengröße des Membranschlauchs, aus dem für die Versuche entsprechend große Quadrate geschnitten werden, wurde so gewählt, daß Moleküle bis zu einem Molekulargewicht (MG) von 12 - 14000 durchtreten können. Somit ist sichergestellt, daß das SHBG, das der Albuminfraktion des Plasmas angehört und ein MG von rund 52 000 aufweist, nicht die Membran durchdringen kann, während der Austausch des Östradiols (MG 272) in beide Richtungen rasch erfolgt.

Das Absorptionsverhalten der Membran dagegen spielt bei der Plasmadialyse keine wesentliche Rolle. Es kann vorausgesetzt werden, daß die Zellenhälften und Membranseiten die die gleiche Oberfläche und Form besitzen und aus gleichem Material bestehen, auch dieselbe Menge an Dialysebestandteilen absorbieren und somit das Ergebnis nicht beeinflussen.

Dagegen ist eine sorgfältige Vorbehandlung der Membranen von großer Bedeutung. Es müssen eingelagerte Verunreinigungen entfernt werden, um von dieser Seite aus störende Effekte auf die Bestimmung der freien Östradiolmoleküle auszuschalten. Es wurde daher streng nach folgender Vorschrift (1o) verfahren:

1. Vorwaschen mit dest. Wasser ca. 15 Minuten lang, Wasser 1o mal dekantieren.
2. Einlegen der Membranen in 25 - 3o %iges Äthanol (siehe Materialliste,B.II.a.) genau 1o Minuten (zu langes Einlegen in Äthanol führt bei der verwendeten Cellulose zu Schrumpfungen und unkontrollierten Porenverengungen).
3. Auswaschen mit dest. Wasser 2o Minuten, dabei 1o mal Wasser abgießen.
4. Quellen und Sättigen der Membran im Dialyse-Puffer (siehe B.II.a.),15 Minuten.
5. Puffer anschließend erneuern.

Die Membranen können nach diesem Vorgang im Puffer über längere Zeit im Kühlschrank aufbewahrt werden.

B. I. d. Einlegen der Membran in die Kammern
Aufbau der Zellenblöcke

Durch Abtropfen werden die Membranen von überschüssigem Lösungsmittel befreit, auf die Zellenhälfte B (siehe Abbildung 2) gelegt und leicht gespannt. Es ist darauf zu achten, daß die Membranen nicht zu fest getrocknet werden (kein Filterpapier benutzen) , da sie sonst wellig werden und an der Teflonkammer anhaften. Das Einfüllen der Kammern gelingt dann nicht mehr vollständig. Man preßt die Zellenhälfte B mit daraufliegender Membran und bringt die Ein-

füllöffnungen durch gegenseitiges Verdrehen der Kammern zur Deckung. Zum Zusammenbau der Zellenblöcke werden Federadapter zwischen die Zellen gesteckt und mit Mitnehmer- und Antriebsflansch entsprechend der Abbildung verschraubt.

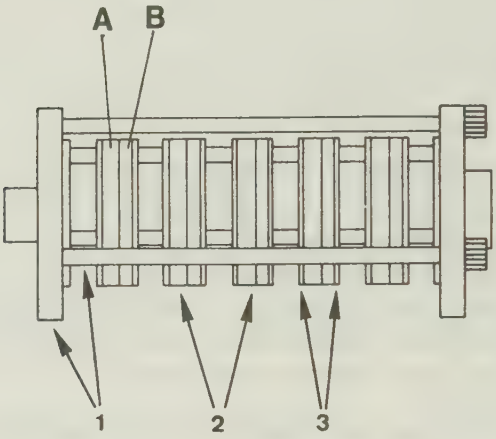

Abb. 2 Schematische Darstellung des Zellenblocks.

Der Zellenblock setzt sich aus folgenden Einzelteilen zusammen:

1. Mitnehmer- oder Antriebsflansch mit drei Distanzstangen,
2. 5 Dialysezellen aus Teflon bestehend aus Deckel (B) und Gehäuse (A) mit eingearbeiteter Dichtung,
3. 6 Feder-Press-Adaptern

ferner einem Lagerflansch und drei Rädelmuttern

B. I. e. Das Füllen und Leeren der Dialysezellen

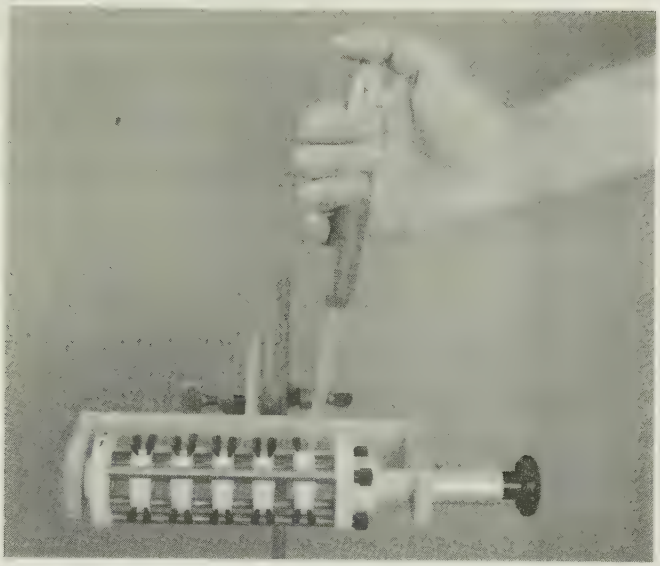

Abb. 3 Füllstativ mit eingespanntem Zellenblock

Zum Füllen befinden sich auf der Oberseite der Dialysezellen je Zellenhälfte zwei Bohrungen, die sich mit Stöpsel verschließen lassen: Eine Bohrung dient zum Füllen, die andere zur Entlüftung. Der Durchmesser der Bohrungen ist so bemessen, daß die üblichen Größen der Einmalpipetten zum Einfüllen benutzt werden können. Das Einspritzen der Plasmalösungen bewirkt leicht Schaumbildung in den Kammern und kann Teile des Probenmaterials wieder aus dem Entlüftungsloch heraustreiben. Aus diesem Grunde wurde das max. Dialysiervolumen pro Halbzelle von 1000 µl nicht voll ausgenutzt. Eine Füllmenge

von 900 µl dagegen konnte ohne Schwierigkeiten in die Kammern gebracht werden. Von Vorteil sind die geringeren Füllmengen außerdem, weil der Mischeffekt des Dialysats besser ist und dadurch die Dialysezeiten kürzer werden. Das minimale Arbeitsvolumen von 700 µl darf jedoch nicht unterschritten werden, da sonst die Gefahr des Austrocknens der Zellen besteht.

Nach dem Füllen der Zellen ist auf sorgfältiges Verstöpseln der Kammern zu achten, damit nicht der Kammerinhalt durch die Badflüssigkeit verunreinigt wird. Aus denselben Gründen muß später vor dem Entleeren der Kammern der Zellenblock gut abgetrocknet werden.

Die Entleerung der Kammern nach der Dialyse geht folgendermaßen vor sich: Nachdem man den Zellenblock in das Füllstativ eingespannt hat, zieht man, links beginnen, zuerst den Entleerungsstöpsel an der Unterseite der ersten Halbzelle, hält unter das Entleerungsloch ein ausgeglühtes (16) Halbmikro-Reagenzglas und entfernt den entsprechenden Entleerungsstöpsel auf der Oberseite. Mit einer 500 µl Einmalpipette drückt man Luft in die Kammer und treibt das Dialysat durch die Entleerungsbohrung in das daruntergehaltene Reagenzglas. Die drei anderen Stöpsel der Kammer auf der Oberseite dürfen bei Entleeren vorher nicht gezogen werden. Es entsteht sonst kein Überdruck in der Kammer und gelegentlich vorhandene Fibringerinsel können nicht durch die feine Entleerungsbohrung gepreßt werden. Weiterhin ist darauf zu achten, daß vor dem Entleeren der

der nächsten Zellenhälfte die Kammerunterseite von evtl. noch anhaftendem Dialysat zu reinigen ist.

Reinigung der Kammern

Nach dem Ausfüllen des Dialysats zerlegt man die Zellenblöcke durch Entfernen der Rädelmutter und entnimmt die nun radioaktiv kontaminierten Membranen mit einer Pinzette. Hierbei und bei der anschließenden Säuberung der Teflonkammern muß ein Verkratzen der Zellen und besonders des Dichtungsringes auf der Zellenhälfte A vermieden werden. Zur Reinigung spült man die Kammern zuerst fünfmal mit destilliertem Wasser, dann zweimal mit Aceton (siehe Materialliste B. II. a.) und trocknet die Kammern an der Luft. Aus den Füll- und Entleerungsbohrungen läßt sich das Wasser-Aceton-Gemisch mit Druckluft herausblasen. Bei einer Kontrolle des Reinigungsverfahrens wurde keine Restaktivität mehr gefunden.

B. II. Reagenzien und Lösungen

B. II. a. Die verwendeten Reagenzien

1. Radioaktiv markiertes 2,4,6,7 - ^{3}H - Östradiol
   Fa. AMERSHAM BUCHLER, Braunschweig
   spezifische Aktivität 85 Curie/mmol
   entspr. 304 mCi/mg
   Die Lösung wurde über Sephadex LH 20 mit Benzol: Äthanol (95:5) als Laufmittel gereinigt;
2. Benzol: Nr. 1783 Benzol p.a. Merck Darmstadt
3. Aceton: Nr. 14 rein Merck Darmstadt
4. Äthanol: Nr. 8006 Äthanol p.a. Baker,D 608 Groß-Gerau
5. Kaliumhydrogenphosphat KH_2Po_4 p.a. Nr. 4873 Merck Darmstadt
6. Natriumazid NaN_3 Nr. 6688 Merck Darmstadt
7. Di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat $Na_2HPo_4 \cdot 2H_2o$ Nr. 6580 Merck Darmstadt
8. Methanol rein Nr. 6006 Merck Darmstadt
9. Dioxan reinst Nr. 3115 Merck Darmstadt
10. PPO = (2,5-Diphenyloxazol) Fa. Zinsser Frankfurt (Main)
11. POPOP = 1,4-bis-2- (5-Phenyloxazolyl)-benzol Fa. Zinsser Frankfurt.
12. Gammaglobulin vom Rind, trocken, rein, Behringwerke Marburg
13. Naphthalin für Szintillationsmessungen, Merck Darmstadt

Alle Lösungen, bei denen Wasser vorgeschrieben war, wurden mit Aqua destillata pro injektione DAB 7 angesetzt.

B. I. b. Der verwendete Puffer

Für alle Lösungen und Verdünnungen wurde folgender Puffer verwendet

Puffer pH 7,2: 2,686 g KH_2PO_4
8,356 g $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$
0,325 g $Na N_3$
1,0 g γ-Globulin
Aqua bidest. ad 1000 ml

B. II. c. Herstellung der radioaktiven Östradiollösung in Puffer:

Bei den Untersuchungen wurde immer von einer sog. Stammlösung ausgegangen, die etwa 300 pg markiertes Östradiol in 1 ml Puffer enthielt.

Die Originalampulle enthielt 250 μ Curie; der Ampulleninhalt war mit Benzol auf 50 ml gebracht worden, um die Selbstzerstrahlungsrate herabzudrücken. Bei einer spezifischen Aktivität von 85 Ci / mmol und einem MG von 272 entsprechen 250 μ-Curie 833 ng Östradiol, enthalten in 50 ml Lösung. Von dieser Lösung des Östradiols in Benzol wurde 1 ml auf dem Wasserbad bei 37° C eingedampft und in 50 ml Puffer aufgenommen. Bei Bedarf wurde diese Stammlösung verdünnt. Sie konnte im Schliffkolben bei 4° C einen Monat aufbewahrt werden und enthielt 30 x 10^3 cpm (counts per min) in 900 µl bzw. etwa 300 pg ^{3}H-Östradiol.

B. III. Die Aufbereitung der Proben

B. III a. Bestimmung der Radioaktivität der Proben

Die nach B.I.e. gewonnenen Dialysate wurden zur Bestimmung der Radioaktivität aus den Glasröhrchen in Zählgefäße pipettiert, die von der Firma Zinsser Frankfurt bezogen wurden.
Bei der Entleerung der Kammern konnte nicht der gesamte, ursprünglich einpipettierte Inhalt gewonnen werden. Ein Teil des Dialysats blieb immer entweder an den Kammerwandungen oder an der Membran haften. Dagegen konnte man immer mit Sicherheit 500 µl ausfüllen. Diese 500 µl wurden in die Zählgefäße einpipettiert, die mit ca. 10 ml der Dioxan-Szintillatorflüssigkeit gefüllt waren.

Zusammensetzung der Dioxan-Szintillatorflüssigkeit

200,0 Naphthalin
40,0 PPO
0,6 POPOP
ad 2000 Dioxan

Nach dem sorgfältigen Verschließen und Kennzeichnen der Zählröhrchen wurden sie je 10 sec maschinell kräftig durchgeschüttelt.
Für die Bestimmung der Radioaktivität in cpm standen ein Flüssigkeitsszintillationszähler der Firma Packard, Modell Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer 3320, sowie das

Gerät BF Betaszint 5ooo der Firma Berthold, 7547 Wildbad zur Verfügung.

Die Zählausbeuten der Geräte bezüglich Tritium markierter Substanzen lagen bei dem verwendeten Szintillator bei 4o %. Um Zählfehler möglichst gering zu halten, wurde die Zähldauer für alle Proben mit 2o min festgelegt. Die Werte der Proben lagen zwischen 3o und 2o.ooo cpm je nach Art der Probe.

B.III. b. Berechnung des freien und gebundenen Anteils des Plasmaöstradiols

Der prozentuale Anteil des gebundenen Steroids läßt sich durch Messungen der Radioaktivität bestimmen und wird nach der Formel von SLAUNWHITE (29) berechnet:

$$\% \text{ gebundenes Steroid} = 100 \cdot \left[1 - \frac{\text{cpma Volb}}{\text{cpmb Vola}} \right]$$

Dazu werden aus den beiden Zellenhälften A und B einer Dialysekammer die zwei Dialysate a und b gewonnen.

a = Dialysat aus der Zellenhälfte, in die das radioaktive, puffergelöste Steroid eingefüllt wurde

b = Dialysat aus der Zellenhälfte, in die das verdünnte Plasma einpipettiert wurde.

Da immer dieselben Volumina, nämlich 500 µl von a und b in die Zählröhrchen überführt wurden, kann die Berück - sichtigung der Volumina entfallen. Die Formel von SLAUNWHITE vereinfacht sich dann:

$$\% \text{ gebundenes Steroid} = 100 \cdot \left[1 - \frac{\text{cpma}}{\text{cpmb}} \right]$$

B. III. c. Schema des Arbeitsablaufs

In Abbildung 4 ist der Ablauf der Gleichgewichtsdialyse noch einmal zusammengefaßt dargestellt.

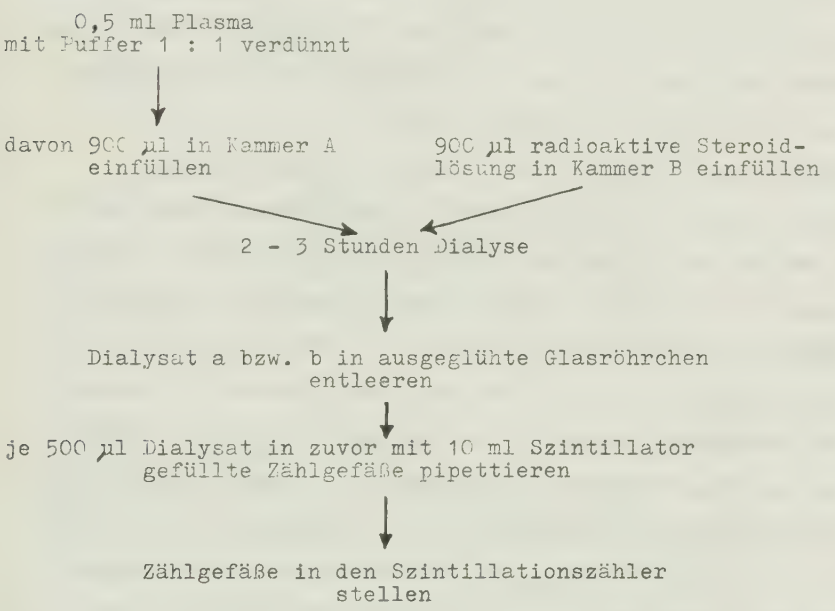

Abb. Nr. 4 Schematische Darstellung der Gleichgewichtsdialyse von Östradiol

B. IV. Vorversuche zur Optimierung der Methode

B. IV.a. Abhängigkeit der Dialyse vom Grad der Plasmaverdünnung

Der Einfluss des Verdünnungsgrades der Plasmaproben auf das Dialyse-Ergebnis wurde an gepooltem Erwachsenenplasma untersucht, das eine Östradiol-Konzentration von 3o pg/ml besaß. Die Verdünnung von Plamaproben mit dem in B. II. b. beschriebenen Puffer ist aus folgendem Grund notwendig: Führt man die Untersuchungen mit unverdünntem Plasma durch, so muß man auf Grund der onkotischen Druckdifferenz zwischen Plasma und Puffer mit einer Volumenverschiebung durch die Membran rechnen. FOREST et al. (11) fanden, daß sich das Plasmavolumen durch Zustrom von Puffer um etwa 12 % erhöht. Bei verdünntem Plasma ist die Volumenverschiebung dagegen viel geringer. Frühere Dialyseversuche wurden deshalb vielfach bei einer Verdünnung von 1 : 5 vorgenommen (11,12,25). Da man aber bemüht sein muß, die Konzentration der radioaktiven Lösung möglichst den Konzentrationsverhältnissen des Steroids im Plasma anzugleichen (11), hätte man bei den zu erwartenden niedrigen Östradiolspiegeln nur sehr geringe Mengen radioaktiven Östradiols einsetzen können, was zu so niedrigen Zählausbeuten hätte führen müssen, daß die Genauigkeit der Bestimmungen stark beeinträchtigt worden wären. Um eine geeignete Verdünnung zu ermitteln, wurden vom oben beschriebenen Plasma Verdünnungen in verschiedenen Stufen hergestellt.Die Hormonkonzentrationen der radioaktiven Steroidlösungen wurden vorher bestimmten Östradiolkonzentrationen in den Plamaverdünnungen angepaßt. Mit

jeder Verdünnungsstufe wurden jeweils 5 Gleichgewichtsdialysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgeführt. Dabei wurde der Anteil des proteingebundenen Östradiols in % angegeben.

Tab. 1 Prozentuale Bindung von Östradiol in Abhängigkeit vom Grad der Plasmaverdünnung

Unverdünntes Plasma	$\bar{x}$ = 92,2 %
1 : 1 verdünntes Plasma	$\bar{x}$ = 91,1 %
1 : 2 verdünntes Plasma	$\bar{x}$ = 89,0 %
1 : 5 verdünntes Plasma	$\bar{x}$ = 85,0 %
1 :10 verdünntes Plasma	$\bar{x}$ = 78,9 %
1 :25 verdünntes Plasma	$\bar{x}$ = 58,5 %

Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse (Abb. 5) zeigt, daß mit steigender Verdünnung des Plasmas der prozentuale Anteil des gebundenen Steroids konstant abfällt. Für die folgenden Versuche wird eine 1 : 1 Verdünnung gewählt, da diese nur eine geringe Volumenverschiebung verursacht und den physiologischen Verhältnissen ähnlich ist.

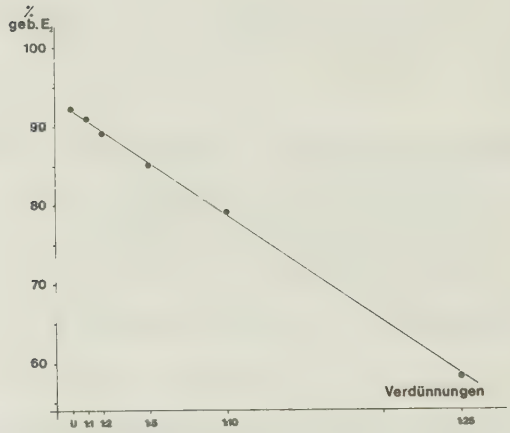

Abb. 5 Abhängigkeit der prozentualen Bindung des Steroids vom Grad der Plasmaverdünnung

% geb. E_2 : prozentualer Anteil des an Protein gebundenen Östradiols (E_2)

U : unverdünntes Plasma

B. IV. b. Abhängigkeit des Gleichgewichts von der Dialysedauer

Aus dem in B.I.a. beschriebenen Prinzip der Gleichgewichtsdialyse geht hervor, daß bei dem Austausch der Steroide durch die Membrane erst nach einer gewissen Zeit ein Gleichgewichtszustand erreicht wird. Die Zeitdauer bis zur Einstellung des Gleichgewichtes hängt neben anderen Parametern (1. Fick 'sches Gesetz) auch von der Menge des Dialysiergutes ab. Die genaue Kenntnis des zeitlichen Verlaufs dieser Gleichgewichtseinstellung ist notwendig, um den Test auf konstante Dauer normieren zu können. Außerdem ist es wichtig zu wissen, ob es nach Einstellung des Gleichgewichts bei längerer Dialysedauer (zum Beispiel über Nacht) wieder zu einer Abnahme der prozentualen Bindung kommt.

Die Abhängigkeit des Dialysegleichgewichtes von der Zeit wurde wie im Vorversuch mit gepooltem Plasma mit einem Östrogengehalt von 30 pg/ml untersucht. Dazu wurde die Prozentuale Bindung von Östradiol nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten zwischen einer halben und 12 Stunden ermittelt. Die Ergebnisse dieser Inkubationsversuche sind in Abb. 6 dargestellt.

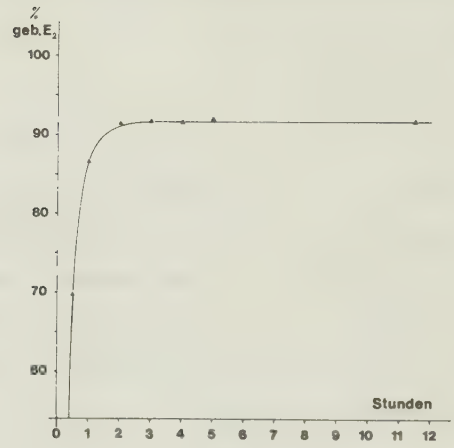

Abb. 6 Abhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung von der Zeit

% geb. E_2 : prozentualer Anteil des an Protein gebundenen Östradiols

Die Graphik zeigt, daß bereits nach 2 Stunden das Gleichgewicht erreicht ist. Aufgrund der raschen Gleichgewichtseinstellung und der lang anhaltenden Plateauphase war es möglich, die Dialysedauer zwischen 2 und 12 Stunden zu variieren. Während dieser Zeitspanne ist eine erneute Abnahme der Bindung - z. B. durch Zerstörung des bindenden Proteins - nicht zu erkennen.

B. IV. c. Abhängigkeit der Dialyse von der Konzentration des radioaktiven Östradiols

Wie in B. IV. a. erwähnt, ist eine wichtige Voraussetzung für ein genaues Dialyse-Ergebnis, daß radioaktives Östradiol in der einen und nicht radioaktives Östradiol in der anderen Halbzelle etwa in der gleichen Größenordnung vorliegen.Die absoluten Östradiolspiegel der meisten Plasmen kindlicher Probanden waren vor der Dialyse nicht bekannt. Die Menge an radioaktivem Östradiol wurde daher aufgrund grober Schätzungen festgelegt.Beim männlichen Geschlecht ändern sich die Östradiolspiegel im Laufe der Entwicklung von 5 pg/ml bis zu 5o pg/ml . Um sicher zu sein, daß Unterschiede von einer Zehnerpotenz zwischen der Konzentration von Plasmasteroid und der des radioaktiven Steroids keine Auswirkung auf die Dialyse-Ergebnisse haben, wurde folgende Untersuchung durchgeführt:
Verwendet wurde gepooltes Mädchenplasma mit einem Östradiolgehalt von 3o pg/ml. Es wurde mit Dialysepuffer auf eine Konzentration von 15 pg/ml verdünnt und diese Verdünnung in gleiche Portionen aufgeteilt.Vom radioaktiven Steroid wurden Verdünnungen mit Konzentrationen von 2 pg/ml bis 6oo pg/ml hergestellt,die gegen konstante Konzentrationen des Plasmasteroids dialysiert wurden. Die Ergebnisse dieser Unter - suchungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2 Abhängigkeit der Dialyse von der Konzentration des radioaktiven Östradiols

Verhältnis von radioaktivem Östradiol zu Plasmaöstradiol	prozentuale Bindung (Mittelwerte aus jew. 4 Bestimmungen)
4o : 1	91,7 %
2o : 1	92,6 %
1o : 1	92,o %
2 : 1	91,6 %
1 : 1	91,5 %
1 : 2	91,6 %
1 : 4	92,o %
1 : 8	92,7 %

Ergebnis:
Unterschiede innerhalb zweier Zehnerpotenzen zwischen Plasmasteroidspiegel und Konzentration des radioaktiven Steroids ergeben keine grobe Abweichung. Offensichtlich besteht über einen weiten Bereich keine Abhängigkeit der prozentualen Bindung von der Konzentration des radioaktiven Steroids. Es ist somit gerechtfertigt, die endogenen Östradiolspiegel lediglich nach dem Reifestadium der Patienten abzuschätzen und die radioaktive Standardlösung entsprechend einzustellen.

B. IV. d. Wahl des pH-Wertes der Pufferlösung und der Temperatur des Wasserbades

FOREST und Mitarbeiter (11) konnten in eingehenden Untersuchungen nachweisen, daß die Verwendung von Puffern mit verschiedenen pH-Werten von 6 bis 9 keinen Einfluß auf das Dialyse-Ergebnis haben. Zu den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde ein Puffer mit einem pH-Wert von 7,2 gewählt (siehe B. II. b.) der den physiologischen Verhältnissen nahe kommt.
Auch die Temperatur des Wasserbades entsprach mit $37,0 \mp 0,1^{\circ}$ C physiologischen Bedingungen. Sie wurden durch ein Thermomix- Gerät der Firma Bender in engen Grenzen konstant gehalten und regelmäßig mit einem Eichthermometer kontrolliert. Die Vergleichbarkeit aller Dialysen von diesem Aspekt aus war sicher gewährleistet.

B. V. Qualitätskontrolle, Praktikabilität und Diskussion der Methode

B. V. a. Reproduzierbarkeit innerhalb der Serie und von Tag zu Tag

Die Reproduzierbarkeit innerhalb der Serie wurde mit gepooltem Männerplasma mit einem absoluten Östradiolgehalt von 30 pg/ml bestimmt. Es wurden 18 Dialysen in einem Ansatz gleichzeitig durchgeführt. Die Bindung von Östradiol betrug 91,4 % $\mp$ 0,55 (Mittelwert $\mp$ Standardabweichung). Es ergab sich ein Variationskoeffizient von 0,6.

Die Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag wurde mit dem gleichen Plasma an 16 verschiedenen Tagen in Doppelbestimmungen ermittelt. Die Bindung von Östradiol betrug im Mittel 91,4 % bei einem Variationskoeffizienten von 0,8.

B. V. b. Praktikabilität der Methode

Die Methode ermöglicht die Doppelbestimmung von 10 Patientenplasmen pro Tag, durchgeführt von einer Person. Das Vorbereiten der Membran und der Plasmen, sowie das Füllen der Kammer benötigen rund zwei Stunden. Die Dauer der Dialyse ist mit etwa drei Stunden zu veranschlagen (vergl. B. IV. b., Zeitabhängigkeit der Dialyse). Das Entleeren der Dialysekammern, das Überführen der Dialysate in die Zählröhrchen und das Reinigen der Apparatur nehmen nochmals ca. eineinhalb bis zwei Stunden

in Anspruch. Das Gerät kann während der dreistündigen Dialyse unbeaufsichtigt laufen. Verdunstete Badflüssigkeit muß nach jeder Dialyse ersetzt werden.

B V. c. Diskussion der Methode

Vergleicht man den Zeitaufwand dieser Dialysemethode mit dem anderer Verfahren gleichen Prinzips (11,25), so stellt man fest, daß wegen der geringen Dialysiermengen die Dialysezeiten erheblich kürzer sind (3 Stunden gegenüber 8 Stunden). Das Füllen und Entleeren der Kammern ist wesentlich einfacher und sicherer als das Arbeiten mit Dialysierschläuchen. Diese werden beim Füllen und Entleeren sehr leicht beschädigt oder können während der Dialyse platzen. Im Gegensatz zu anderen Untersuchern konnten wir auf eine spezielle Extraktion des Steroids aus dem Plasma nach der Dialyse verzichten, da das radioaktive Steroid nur auf ein geringes Dialysat-Volumen verteilt war und sowohl die wäßrige Phase als auch das Steroid selbst durch den Dioxan-Scintillator aufgenommen werden. Weiterhin ist bei der beschriebenen Methode von Vorteil, daß die Dialyse im geschlossenem System erfolgt und Verdunsten des Dialysats unmöglich ist. Die Genauigkeit der Methode ist der anderer Methoden vergleichbar (25). Wegen des geringen Plasmabedarfs erlaubt die Methode auch Untersuchungen an Kleinkindern, denen größere Blutabnahmen nicht zuzumuten sind.

C. Proteinbindung von Plasma-Östradiol unter physiologischen Bedingung

C. I. Auswahl der Probanden und Gewinnung der Plasmen

Untersucht wurden Plasmen von 61 Jungen im Alter von 2 Monaten bis 16 Jahren und von 59 Mädchen im Alter von 4 Monaten bis 12 Jahren. Die Plasmaproben der Kinder bis zum 14. Lebensjahr stammten aus der Universitäts-kinderklinik München, die der Jungen vom 14. bis zum 16. Lebensjahr aus den Chirurgischen Abteilungen der Kreiskrankenhäuser Freising und Moosburg. Es wurden nur Plasmen von Patienten untersucht, die nicht an endokrinen Erkrankungen litten oder deren Erkrankung oder Therapie das Endokrinium nicht beeinflußte. Die Blutproben wurden tagsüber zwischen 7^{30} h und 17^{00} h in heparinisierte oder EDTA-beschichtete Röhrchen abgenommen. Die Plasmen wurdenbis zur Bestimmung bei - 20 ^{o} C aufbewahrt. Daß das Einfrieren die prozentuale Bindung der Sexualhormone nicht beeinflußt, war von FOREST et al. früher nachgewiesen worden (11). Sie hatte keine Veränderungen der Bindung gefunden, wenn das Plasma mehrere Male eingefroren und wieder aufgetaut wurde. Trotzdem wurden für die vorliegende Arbeit die Plasmen, die öfters untersucht werden sollten, wie z. B. zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse von Tag zu Tag (B V. a.) in entsprechende Mengen aufgeteilt und in Kunststoffröhrchen eingefroren.

C. II. Proteinbindung von Plasma-Östradiol bei gesunden Mädchen

Der prozentuale Anteil gebundenen Östradiols wurde bei 59 Mädchen im Alter von 4 Monaten bis 12 Jahren ermittelt. Die Mädchen wurden in verschiedenen Gruppen unterteilt. Gruppe 1 umfaßte 25 Mädchen im Alter von 2 - 6 Jahren, Gruppe 2 31 Mädchen im Alter von 7 - 12 Jahren. Die Unterteilung in 2 Gruppen erfolgte wegen des Auftretens der Adrenarche, die etwa mit Beginn des 8. Lebensjahres einsetzt (26,28,18). Von diesem Zeitpunkt an ändern sich die Plasmaspiegel der von der Nebenniere produzierten Geschlechtshormone. In die 3. Gruppe wurden Mädchen bis zum Ende des 2. Lebensjahres aufgenommen, da die Sexualhormonspiegel in den ersten Lebensmonaten sowohl bei Jungen als auch bei Mädchen deutlich von den späteren präpubertären Verhältnissen abweichen (4). Die für die jüngste Altergruppe gewonnenen Werte der prozentualen Bindung des Östradiols wurden zwar in die Abb. 7 eingetragen, für die statistische Auswertung jedoch standen zu wenige geeignete Probanden zur Verfügung.

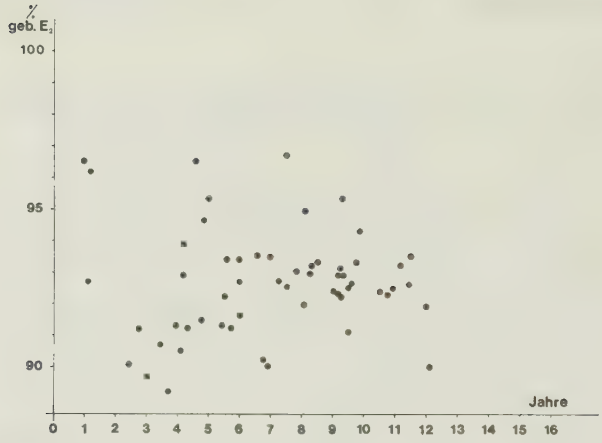

Abb. 7 Prozentuale Bindung von Östradiol (% geb. E_2) bei gesunden Mädchen in Abhängigkeit vom Alter

Aus der Abb. 7 ist zu entnehmen,daß die Werte des protein - gebundenen Anteils von Plasma - Östradiol in einem Bereich von 89,2 % bis 96,7 % streuen.Bei der Gruppe der 2 - bis 6 - jährigen Mädchen errechnet sich ein Mittelwert von 92,1 %. Bei den 7 - bis 12 - jährigen Mädchen beträgt die Bindung im Mittel 92,7 %.Der Vergleich der Mittelwerte der beiden Gruppen ergibt eine Differenz von etwa o,5 %.Der t - Test nach Student zeigt keinen signifikanten Unterschied ($2p > o,o1$).Durch die

Werte läßt sich eine Regressionsgerade mit einer Steigung von tan α = 0,01 (α = 1°) legen. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,022 bei einer Fallzahl von 56. Graphische Auswertung und Statistik lassen keine Veränderung des prozentual gebundenen Östradiols mit zunehmenden Alter erkennen.

C. III. Protein-Bindung von Plasma-Östradiol bei gesunden Jungen

Der prozentuale Anteil gebundenen Östradiols bei 61 Jungen im Alter von 2 Monaten bis 16 Jahren wurde ermittelt. Die Probanden wurden unter Berücksichtigung der Adrenarche in verschiedene Gruppen unterteilt (25,27,17). Gruppe 1 umfaßt 20 Jungen im Alter von 2 bis 16 Jahren und Gruppe 2 40 Jungen im Alter von 7 bis 16 Jahren. Die Bildung einer 3. Gruppe, wie dies bei den Mädchen geschah (C. II.), entfiel hier, da nur 1 Meßwert eines Jungen mit 2 Monaten ermittelt wurde.

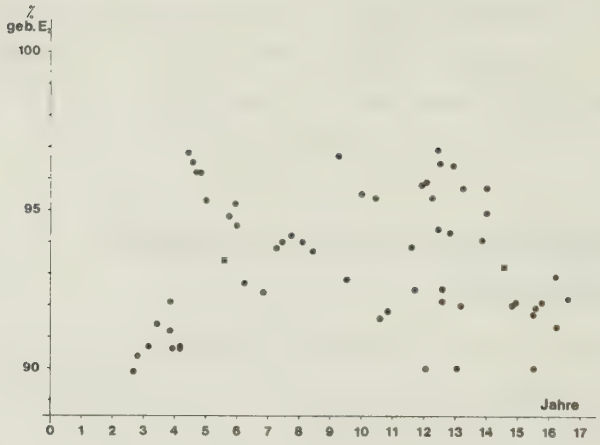

Abb. 8 Prozentuale Bindung von Plasma-Östradiol (% geb. E_2) bei gesunden Jungen in Abhängigkeit vom Alter

Die Werte der prozentuale Bindung von Östradiol in Abhängigkeit vom Alter liegen bei 2- bis 16-jährigen Jungen in einem Bereich von 89,9 %. Bei der Gruppe der 2- bis 6-jährigen ergibt sich ein Mittelwert von 93,1 %, bei den 7- bis 12-jährigen ein solcher von 94,2 %. Die Mittelwerte der beiden unterscheiden sich um etwa 1 %. Der t-Test nach Student ergibt keinen signifikanten Unterschied ($2\ p > 0{,}01$). Die Regressionsgerade zeit mit einer Steigung von $\tan \alpha = 0{,}01$ ($\alpha = 1^{o}$) einen nahezu horizontalen Verlauf. Der Korrelationskoeffizient r beträgt 0,022 bei einer Fallzahl von 60. Statistische und graphische Auswertung zeigen keine Veränderung der prozentualen Bindung von Östradiol mit zunehmendem Alter.

C. IV. Vergleich der prozentualen Bindung von Plasma - Östradiol bei gesunden Jungen und Mädchen

Anhand der Plasmaproben von 60 Jungen und 56 Mädchen bis zum Alter von 12 Jahren wurde die prozentuale Bindung von Östradiol bei beiden Geschlechtern verglichen.

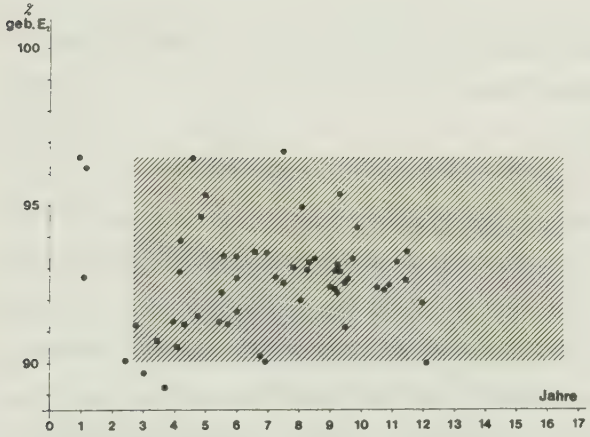

Abb. 9 Vergleich der prozentualen Bindung von Plasma-Östradiol bei gesunden Jungen und Mädchen

% geb. E_2: prozentualer Anteil des an Protein gebundenen Östradiols (E_2)

Schraffierte Fläche : Normalbereich (5. bis 95. Perzentile)gesunder Jungen

Punkte: Individuelle Werte gesunder Mädchen

Die Abb. 9 zeigt, daß die Bindungswerte der 2- bis 12-jährigen Mädchen praktisch alle im Bereich der Werte gleichaltriger Jungen liegen, doch mehr in der unteren Hälfte. Beim Vergleich der arithmetischen Mittelwerte liegt der Wert der Mädchen mit 92,5 % um etwa 1 % unter dem der Jungen mit 93,6 %. Dieser Unterschied ist nach dem t-Test nach Student signifikant ($2p < 0,01$).

D. Protein- Bindung von Plasma-Östradiol bei Mädchen mit Pubertas praecox vera im Vergleich mit gesunden Mädchen

Untersucht wurden die Plasmen von 20 Patientinnen mit idiopathischer Pubertas praecox im Alter von 9 Monaten bis zum Alter von 11 Jahren. Die meisten Mädchen wiesen eine Brustentwicklung entsprechend Stadium II und Stadium III nach Tanner (31) auf. Nur bei einigen wenigen war Stadium IV festzustellen. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 dargestellt. Für die Gruppe der gesunden Mädchen ergibt sich ein Mittelwert von 92,6 %. Der t-Test nach Student zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Es läßt sich eine deutliche Erhöhung des prozentual gebundenen Anteils von Östradiol bei Mädchen mit Pubertas praecox gegenüber gesunden Mädchen feststellen.

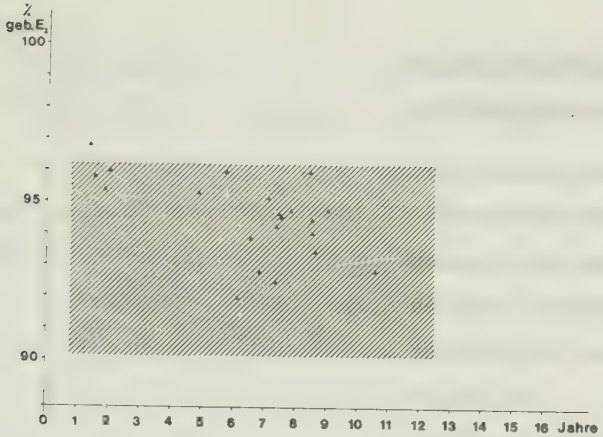

Abb. 10 Prozentuale Bindung von Plasma-Östradiol bei Pubertas praecox vera im Vergleich mit gesunden Mädchen

% geb. E_2: prozentualer Anteil des an Protein gebundenen Östradiols (E_2)

Schraffierte Fläche: Normalbereich (5. bis 95 Perzentile) gesunder Mädchen

Punkte: Individuelle Werte von Mädchen mit Pubertas praecox

E. Protein-Bindung von Plasma-Östradiol bei Jungen mit Pubertätsgynäkomastie im Vergleich mit gesunden Jungen

In der Studie wurden die Plasmen von 15 Patienten mit Pubertätsgynäkomastie im Alter von 10 bis 16 Jahren untersucht und mit den Plasmen von 33 gesunden Jungen der gleichen Altersstufe verglichen. Der Durchmesser des Brustdrüsenkörpers der stärker betroffenen Brust dieser Patienten war auf 3 - 1 o cm vergrößert. Ihre individuellen Bindungswerte wurden mit dem Normbereich gleichaltriger Jungen verglichen (Abb. 11).

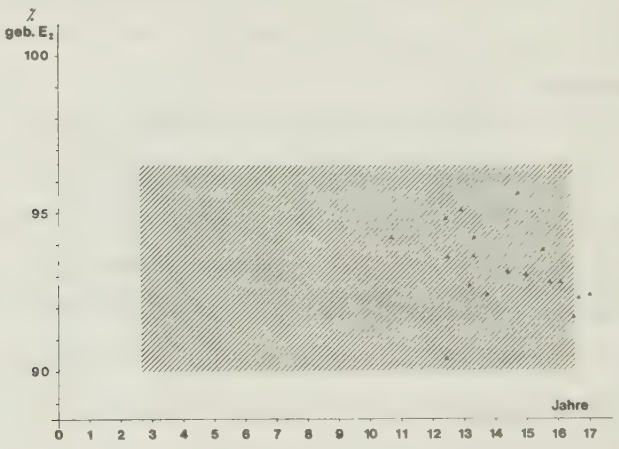

Abb. 11 Prozentuale Bindung von Plasma-Östradiol bei Jungen mit Pubertätsgynäkomastie im Vergleich mit gesunden Jungen

% geb. E_2: prozentualer Anteil des an Protein gebundenen Östradiols (E_2)

Schraffierte Fläche: Normalbereich (5. bis 95. Perzentile) gesunder Jungen

Punkte: Individuelle Werte der Jungen mit Puber-

Die Abb. 11 zeigt, daß alle Werte der Patienten im Normbereich gleichaltriger Jungen liegen. Für die Gruppe der gesunden Jungen ergibt sich ein arithmetischer Mittelwert von 93,4 %, für die Gruppe der Jungen mit Pubertätsgynäkomastie ein Wert von 93,2 %. Die Mittelwerte beider Gruppen unterscheiden sich also kaum.

F. Besprechung der Ergebnisse

Die im Plasma gemessenen Konzentrationen der meisten Steroidhormone geben nur einen ungefähren Anhalt für deren tatsächliche Wirkkonzentration. Nach SLAUNWHITE (29) ist nur der Anteil der Hormone biologisch aktiv, der frei, nicht an Proteine gebunden, im Blut zirkuliert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Ausmaß der Protein-Bindung von Östradiol im Kindesalter bei beiden Geschlechtern zu bestimmen und eventuelle Veränderungen dieser Bindungsverhältnisse im Laufe der Entwicklung festzustellen. Mit den ermittelten Normwerten sollten die Werte von Mädchen mit Pubertas praecox und von Jungen mit Pubertätsgynäkomastie verglichen werden.

Als Meßmethode wurde die Gleichgewichtsdialyse nach FOREST et al. (11) gewählt. Die verwendete Versuchsanordnung mit speziellen, sehr kleinen Dialysekammern ermöglicht die einfache Durchführung der Dialyse mit kleinen Plasmavolumina. Das Ergebnis dieser Messung gibt an, wieviel Prozent der totalen Konzentration des Hormons im Plasma an Protein gebunden ist. Hieraus läßt sich leicht der freie, biologisch aktive Anteil errechnen. Die direkte Bestimmung der absoluten Menge des freien Plasmaöstradiols ist derzeit noch nicht möglich. Indirekt ließe sich diese Größe jedoch aus der Konzentration des totalen Östradiols und dem Ergebnis der Gleichgewichtsdialyse ermitteln. Doch wurde hierauf in der vorliegenden Arbeit

verzichtet, da gerade in den niedrigen Konzentrationsbereichen vor der Pubertät die Konzentrationsbestimmung ungenaue Ergebnisse liefert, deren rechnerische Kombination mit den Ergebnissen der Dialyse nur zu unsicheren Ergebnissen führen würde. Außerdem konnte wegen des relativ großen Plasmabedarfs nicht bei allen Kindern die Bestimmung der Östradiolkonzentration durchgeführt werden.

Albumin bindet mit großer Kapazität Östradiol wie auch andere Steroidhormone (1, 22), doch ist diese unspezifische Bindung so schwach, daß sie kaum einen Einfluß auf die biologische Aktivität der Hormone hat (8). Das wichtigste Protein, durch welches Östradiol im Plasma gebunden wird, ist das Sexualhormon bindende Globulin (SHBG). Seine Affinität ist am stärksten gegenüber den Androgenen, Dihydrotestosteron und Testosteron, schwächer gegenüber den Östrogenen (22). Das Ergebnis der Gleichgewichtsdialyse, d. h. das Verhältnis von freiem zu totalem Hormon, wird im Wesentlichen durch die Konzentration des SHBG bestimmt.

In neuerer Zeit wurde eine Methode zur Bestimmung der Bindungskapazität des SHBG mit Hilfe einer Polyacrylamid-Electrophorese entwickelt (13) . Die Ergebnisse sind sehr

zuverlässig und gut reproduzierbar. Die Methode ist aber apparativ aufwendig und erlaubt wie die Gleichgewichtsdialyse nur einen indirekten Rückschluß auf die aktuelle Konzentration der biologisch aktiven Sexualhormone.

Die Bedeutung des SHBG ist noch unklar. Es ist auch noch unsicher, ob für eine normale Funktion und Regulation der Sexualhormone Sexualhormon bindendes Globulin überhaupt notwendig ist. Ein angeborener Mangel anderer Transportglobuline wie der des Thyroxin bindenden Globulins oder des Corticosteroid bindenden Globulins (Transcortin) führt nicht zu klinisch auffälligen Störungen (14). Der Regulationsmechanismus für diese Hormone läuft in solchen Fällen mit stark erniedrigten totalen Hormonkonzentrationen ab, so daß die nicht proteingebundene Hormonmenge normal hoch ist.

Östrogene und Androgene beeinflussen in unterschiedlicher Weise die Kapazität des SHBG. Während Testosteron zu einer Verminderung des SHBG führt, verursachen Östrogene eine deutliche Erhöhung (33, 23,). Unter der Gabe von Östradiol und besonders ausgeprägt in der Gravidität steigt die Bindungskapazität von SHBG an (23). Entsprechend einer Hypothese von BURKE und ANDERSON (8) dient das SHBG der Regulation des Verhältnisses von freiem Androgen zu freiem

Östrogen. Wegen der höheren Affinität des SHBG zu Testosteron hat ein Östrogen induzierter Anstieg der SHBG-Kapazität eine ausgeprägtere Wirkung auf die Bindung und Inaktivierung von Testosteron als auf die von Östradiol. Das Ergebnis des Anstieges der SHBG-Kapazität ist eine Verschiebung des Verhältnisses von freiem Testosteron zu freiem Östradiol zugunsten des freien Östradiols (3o, 33). Auf der anderen Seite verschiebt die durch die Gabe von Androgenen hervorgerufene Verminderung der SHBG-Kapazität das Gleichgewicht zugunsten des freien Testosterons. Das bedeutet, daß Östradiol und Testosteron ihre biologische Wirksamkeit durch ihren spezifischen Effekt auf die SHBG-Kapazität verstärken (8).

Unsere Untersuchungen ergaben bei gesunden Mädchen vom 2. bis zum 12. Lebensjahr keine altersabhängige Änderung des prozentualen Anteils von gebundenem Östradiol im Plasma. Das bedeutet, daß in dieser Periode die absoluten Östradiolspiegel doch als Maß für die Östradiolaktivität angesehen werden dürfen. Bei Mädchen steigt die totale Östradiolkonzentration im Plasma nach der Adrenarche, d. h. nach dem 8. Lebensjahr und im Verlauf der Pubertät auf etwa das Zehnfache an (3), entsprechend nimmt auch die absolute Menge des freien, biologisch aktiven Östradiols zu. Diese

Zunahme der Östradiolaktivität verursacht eine Vermehrung des SHBG und damit eine Erhöhung der Bindungskapazität, so daß sich das Bindungsgleichgewicht wieder auf das relativ konstante Verhältnis der Kindheit einstellt.

Auch bei gesunden 2- bis 16-jährigen Jungen ist keine Änderung der Bindungsverhältnisse von Östradiol mit steigendem Alter feststellbar. Bei den Jungen konkurrieren während der Pubertät steil ansteigende Testosteronspiegel mit - verglichen mit den Mädchen - nur gering ansteigenden Östradiolspiegeln. Der biologische Einfluß des Testosterons auf das SHBG überwiegt den des Östradiols weit. Als Folge der Testosteroneinwirkung kommt es während der Pubertät beim männlichen Geschlecht zu einer Verminderung des SHBG (29). Da Testosteron und Östradiol um die Bindungsstellen am Protein konkurrieren, wäre bei zunehmender Konzentration der totalen Testosteronspiegel mit vermehrter Verdrängung und Freisetzung von Östradiol zu rechnen. Daß dies in unseren Experimenten nicht nachweisbar war, liegt möglicherweise daran, daß beim männlichen Geschlecht die totalen Östradiol-Konzentrationen so niedrig sind, daß der verdrängte Anteil für unsere Methode nicht erfaßbar ist.

Hinsichtlich des Verhältnisses von freiem zu totalem Östradiol waren zwischen Jungen und Mädchen vom Kindesalter bis zur Pubertät keine Unterschiede zu erkennen, bei beiden Geschlechtern sind im Mittel etwa 93 % des Östradiols an Protein gebunden. Natürlich ergeben sich geschlechtsspezifische

Unterschiede,wenn man die absoluten Östradiolspiegel ver - gleicht und daraus die Menge des freien Hormons abschätzt. Hier liegen die Mädchen bereits vor Auftreten der Pubertäts - zeichen höher als die Jungen (6) .

Bei den Mädchen mit idiopathischer Pubertas praecox ließ sich eine etwas höhere prozentuale Bindung und damit eine Ver - minderung des freien Östradiol - Anteils gegenüber gesunden Mädchen nachweisen. Dieser Befund steht nicht im Widerspruch zu der Erwartung, daß bei dieser Störung die biologisch ak - tiven Östrogene erhöht sind. Die Konzentrationen des totalen Östradiols fluktuieren bei der Pubertas praecox stark. Bei allen Patientinnen wechseln Phasen normaler Plasmaspiegel mit Phasen deutlich erhöhter Spiegel ab (5) , so daß trotz vermehrter Proteinbindung die absolute Menge des freien Östradiols immer wieder erhöht ist. Die relativ stärkere Bindung läßt sich durch eine Erhöhung der SHBG - Kapazität erklären, die ihrerseits Folge der insgesamt vermehrten Östradioleinwirkung ist.Warum bei Mädchen mit Pubertas praecox die Proteinbindung des Östradiols höher ist als bei Mädchen in der normalen Pubertät mit oft erheblich höh - eren Östradiolwerten, ist unklar.Möglicherweise sind die Östrogenrezeptoren in den Zielorganen bei Kindern mit Puber - tas praecox empfindlicher als in späteren Entwicklungsphasen und bewirken schon bei kleinen Östrogenerhöhungen stärkere Veränderungen in den Zielorganen. Für das Zielorgan Leber würde das bedeuten, daß sie mehr SHBG produziert als während

der normalen Pubertät. Die erhöhte Empfindlichkeit der Östrogenrezeptoren würde auch die Beobachtung von BIDLING - MAIER et al. (5) erklären,daß Mädchen mit Pubertas praecox wesentlich niedrigere Östradiolspiegel haben,als nach ihrer Entwicklung zu erwarten wäre, d.h. sie haben weniger Östradiol als normal reifende Mädchen mit gleichen Reife - zeichen.

Jungen mit Pubertätsgynäkomastie unterscheiden sich von ge - sunden Jungen weder in ihren absoluten Östrogen - noch in ihren absoluten Testosteronspiegeln (2, 2o). Nach den Unter - suchungen von BIDLINGMAIER und KNORR (2) sowie von LEE (2o) liegen nahezu alle Werte der Sexualhormonkonzentrationen der betroffenen Jungen im Normalbereich der entsprechenden Ent - wicklungsstufe. Eine Störung des Gleichgewichtes zwischen Testosteron und Östradiol ist ebenfalls nicht zu beobachten. Auch aus unseren Untersuchungen ergab sich kein pathologischer Befund. Eine signifikante Verschiebung des Gleichgewichts zwischen freiem und gebundenem Östradiol bei Gynäkomastie im Vergleich zu normalen Jungen war nicht feststellbar.

Die Ursache für die relativ häufige Pubertätsgynäkomastie ist noch unklar. Viele mögliche Faktoren sind bisher untersucht worden (2, 5, 19, 34) : die Gonadotropine, das Prolaktin , die Östrogene und Androgene in Blut und Urin sowie das Ver - hältnis von Androgenen zu Östrogenen. Alle diese Parameter erwiesen sich als normal. Schließlich wurde eine Verschie -

bung des Gleichgewichtes zwischen freiem und gebundenem Östradiol mit Vermehrung der freien Hormonfraktion diskutiert (6). Doch nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist auch diese Störung als Ursache für das Auftreten der Gynäkomstie bei Jungen in der Pubertät unwahrscheinlich.

G. Zusammenfassung

Um Rückschlüsse auf den freien , biologisch wirksamen Anteil des totalen Plasmaöstradiols ziehen zu können, wurden mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse bei 59 gesunden Mädchen und 61 gesunden Jungen während der Kindheit und der Pubertät der an Protein gebundene, prozentuale Anteil von Östradiol im Plasma bestimmt. Eine Veränderung des Verhältnisses von freiem zu gebundenem Östradiol im Verlauf der Entwicklung von der Kindheit bis hin zur Adoleszenz konnte weder bei den Mädchen noch bei den Jungen festgestellt werden. Auch beim Vergleich der Werte von Mädchen und Jungen waren Unterschiede in der prozentualen Bindung nicht erkennbar. Zur Beantwortung der Frage, ob die trotz relativ niedriger Östradiolspiegel oft starke Brustentwicklung bei Jungen mit Pubertätsgynäkomastie und bei Mädchen mit Pubertas praecox auf eine geringere Bindung von Östradiol an Protein zurückzuführen ist, wurden die Bindungswerte der gesunden Probanden mit den Werten von 2o Mädchen mit idiophatischer Pubertas praecox und 15 Jungen mit Pubertätsgynäkomastie verglichen. Bei den Mädchen mit Pubertas praecox war der prozentual gebundene Anteil des Östradiols im Plasma etwas erhöht, was auf eine Erhöhung der Kapazität des Sexualhormon bindenden Globulins infolge der erhöhten totalen Östradiolspiegel hinweist. Die Jungen mit Pubertätsgynäkomastie zeigten im Vergleich mit gesunden, gleichaltrigen Probanden keinen Unterschied im Anteil des proteingebundenen Plasmaöstradiols. Eine Verschiebung des Bindungsgleichgewichtes läßt sich als Erklärung für die ausgeprägten Feminisierungszeichen daher bei beiden Störungen nicht annehmen.

Literaturverzeichnis

1. Baulieu, E. E., Raynaud, J. P., and Milgrom,E.: Measurement of steroid binding protein. Acta Endocrinol. Suppl. 147: 1o4 - 122 (197o)
2. Bidlingmaier, F., Knorr, D.: Plasma testosterone and estrogens in pubertal gynecomastia. Z. Kinderheilkunde 115 : 89 - 94 (1973)
3. Bidlingmaier, F., Wagner-Barnack, M., Butenandt, O., Knorr, D.: Plasma estrogens in childhood and puberty under physiologic and pathologic conditions. Pediat. Res. 7 : 9o1 (1973)
4. Bidlingmaier, F., Versmold, H., Knorr, D.: Plasma estrogens in newborns and infants. In : M. G. Forest, J. Bertrand (Eds.): Endocrinologie sexuelle de la période périnatale 299 - 314, (Editions J. N. S. E. R. M., Vol.32, Paris 1974
5. Bidlingmaier, F., O. Butenandt, and D. Knorr: Plasma gonadotropins and estrogens in girls with idiopathic precocious puberty. Pediat. Res. 11: 91 - 94 (1977)
6. Bidlingmaier, F., Knorr, D. : Estrogens - Physiological and clinical aspects. S. Karger Verlag, Basel (1978)
7. Bruining, G. J., Smith, J., Forbes, G.B. Bergink, E. W., Wittliff, J. L.: Alterations in plasma testosterone and sex hormone binding globulin during puberty (Abstract). Pediat. Res. 1o : 878 (1976)
8. Burke, C. W., and D. C. Anderson : Sex-hormone-binding globulin is an estrogen amplifier. Nature 24o:38 (1972)

9. " Dianorm " Fa. Bachofer, 7411 Reutlingen

1o. Betriebsanleitung Dianorm, Fa. Bachofer, 7411 Reutlingen

11. Forest, M. G., M. A. Rivarola, and C. J. Migeon: Percentage binding of testosterone, androstenedione and dehydroisoandrosterone in human plasma. Steroids 12 : 323 (1968)

12. Forest, M. G., A. M. Cathiard, and J. A. Bertrand: Total and unbound testosterone levels in newborn and in normal and hypogonadal children: Use of a sensitive radio-immuno assay for testosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 36 : 1132 (1963)

13. Georges, P., Brijawi, A., Evain, D., Savage, M., Chaussain, J. L. : Binding capacity of serum testo-sterone-estradiol binding globulin (TeBG) in males; variation with age and pathological conditions (Abstract). Pediat. Res. 1o : 885 (1976)

14. Heinonen, O. P., Lamberg, B. - A., Virtamo, J.: Inherited decrease of the binding of thyroxine-binding globulin (TBG). Acta Endocrinol. Metab. 64: 171 - 18o (197o)

15. Knorr, D.: Die Bestimmung von Testosteron im Harn und im Plasma durch Gaschromatographie mit Elektronen-empfang-Detektor. In: Methoden der Hormonbestimmung. Breuer, Krüskemper (Hrsg.), Thieme Verlag

16. Knorr, D.: Ultrareine Glasgeräte durch Ausheizen bei 500° C. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 9, 175 (1971)

17. Knorr, D., Bidlingmaier, F., Butenandt, O., Fendel, H., Ehrt-Wehle, R.: Plasma testosterone in male puberty. I. Physiology of plasma testosterone. Acta Endocrinol. (Copenhagen) 75 : 181 - 194 (1974)

18. Korth-Schutz, S., L. S. Levine, and M. J. New: Serum androgens in normal prepubertal and pubertal children and in children with precocious adrenarche. J. Clin. Endocrinol. Metab. 42 : 117 (1976)

19. Labhart, A.: Klinik der inneren Sekretion. 2. Aufl. S. 5oo. Springer Verlag 1971

2o. Lee, P. A.: The relationship of concentrations of serum hormones to pubertal gynecomastia.J. Pediat. 86 : 212 - 215 (1975)

21. Mercier-Bodard, C., Alfsen, A.,Baulieu, E. E.: Sex-steroid binding plasma protein (SBP) in Diczfalusy Steroid assay by protein binding; pp. 2o4 -224 Acta Endocrinol. (Copenhagen) Suppl. 147 (197o)

22. Murphy, B. E. P.: Further studies of the specifity of the sex hormone-binding globulin of human plasma. Steroids 16 : 791 - 798 (197o)

23. Pearlman, W., O. Crépy, and M. Murphy: Testosterone-binding levels in the serum of women during the normal menstrual cycle, pregnancy, and the post-partum period. J.Clin. Endocrinol. Metab. 27, 1o12 (1967)

24. Pirke, K. M. Doerr, P.: Age related changes and inter-relationship between plasma testosterone, estradiol and testosterone binding globulin in normal adult males, Acta Endocrinol. 74 : 792 (1973)

25. Radfar, N., Kitti Ansusingha, and F. M. Kenny : Circulating bound and free estradiol and estrone during normal growth and development and in premature thelarche and isosexual precocity, J. Pediat. 89 : 719 (1976)

26. Root, A. W.: Endocrinology of puberty. J. Pediat. 83 : 1 (1973)

27. Rudel, B. T., Duignan,N. M., Lindon, D.R.: A rapid method for the measurement of sex hormone binding capacity of sera. Coin. Chim. Acta, 55 : 165 - 178 (1974)

28. Sizonenko, P. C. and Paunier, L.: Hormonal changes in puberty. III. J. Clin. Endocrinol. Metab. 41 : 894 (1975)

29. Slaunwhite, W. R., Jr. in : Hormones in human plasma. Editor, H. N. Antoniades, Little, Brown and Co., Boston, 482 (196o)

3o. Southren, A. L., Gordon, G. G., Tochimoto, S.: Further study of factors affecting the metabolic clearance rate of testosterone in man, J. Clin. Endocrinol. 28 : 11o5 - 1112 (1968)

31. Tanner, J. M.: Wachstum und Reifung des Menschen. Stuttgart: Thieme 1962

32. Tulchinsky, D., and Chopra, I. J.: Competitive ligand-binding assay for measurement of the sex hormone binding globulin (SHBG). J. Clin. Endocrinol. Metab. 37 : 873 (1973)

33. Vermeulen, A., Verdonck, L., van der Straeten, M., Orie, N.: Capacity of the testosterone-binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance rate, J. Clin. Endocrinol. Metab. 29 : 147o - 148o (1969)

34. Vermeulen, A., Stoica, T., Verdonck,L.: The apparent free testosterone concentration, an index of androgenicity. J.Clin. Endocrinol. Metab. 33 : 759 - 767 (1971)

35. Wieland, R.G.: Pituitary-gonadal function in pubertal gynecomastia. J. Pediat. 79 : 1002 - 1004 (1971)

Lebenslauf:

Name:	Maier
Vorname:	Robert
Geburtsdatum:	22. Mai 1947
Geburtsort:	8000 München
Wohnort:	8050 Freising, Alte Poststr. 11
Eltern:	Vater: Ludwig Maier, Volksschullehrer, 8221 Bergen
	Mutter: Ingeborg Maier, Hausfrau, 8221 Bergen
Ehefrau:	Elisabeth Maier, geb. Rottmüller Zahnarzthelferin
Volksschule:	1953 - 1958 Ramerberg/Wasserburg
Gymnasium:	1958 - 1967 Chiemgau-Gymnasium Traunstein
Abitur:	1967
Studienweg:	1967 - 1969 Pharmazie-Praktikum
	1970 - 1973 Pharmazie-Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	1974 Approbation als Apotheker
Medizinstudium:	Beginn: Wintersemester 1973
	Physikum April 1975
	1. Medizin.Staatsexamen April 1976
	2. Medizin.Staatsexamen April 1978

Ich möchte mich besonders bei Herrn Priv.-Doz. Dipl. Biochem. Dr. med. Frank Bidlingmaier für die stets gewährte, großzügige Unterstützung bedanken. Ebenso zu Dank verpflichtet bin ich dem Direktor der Kinderklinik der Universität München, Herrn Prof. Dr. K. Betke und Herrn Prof. Dr. D. Knorr für die freundliche Überlassung des Arbeitsplatzes.

Mein Dank gilt auch den Med.-Techn. Assistentinnen des Hormonlabors der Kinderklinik, Frau Angelika Diepolder, Frau Eleonore Grove, Frau Annette Kapp, Frau Marianne Wagner-Barnack für die gute Zusammenarbeit und Herrn Dr. rer. nat. Josef Helminger für die Überprüfung der statistischen Berechnungen.